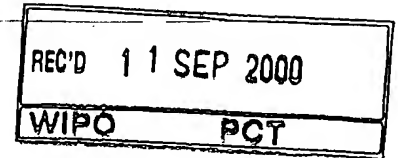


EP00/6313



4

X2

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen:

199 30 729.6

Anmeldetag:

5. Juli 1999

Anmelder/Inhaber:

Professor Dr. Achim Göpferich, Sinzing/DE

Bezeichnung:

Blockcopolymere zur Herstellung biomimetischer
Oberflächen

IPC:

C 08 L, C 08 J, A 61 F

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 1. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Aktivierte Polymere zur gezielten Grenzflächenmodifikation

Zusammenfassung

Die Erfindung umfaßt biokompatible, bioabbaubare Polymere, die aufgrund ihrer Struktur funktionelle Gruppen oder aktivierte funktionelle Gruppen auf Polymeroberflächen so verfügbar machen, daß die chemische Bindung von Molekülen an die Oberfläche möglich ist. Die Polymere bestehen sie aus:

- einer bioabbaubaren Kette,
- einer hydrophilen nicht (oder langsam) bioabbaubaren Kette,
- einer oder mehreren funktionellen Endgruppen oder aktivierten Endgruppen an der hydrophilen Kette.

Die Polymere erlauben die schonende chemische Bindung von Molekülen an Polymeroberflächen vor oder nach der Verarbeitung zu Formkörpern. Die Polymere gestatten die Bindung beliebiger Moleküle, wie z.B. Peptide, Proteine und Enzyme.

15 Damit läßt sich über die Oberfläche von Polymeren eine biologische oder chemische Aktivität erzielen.

Stand der Technik

Bioabbaubare Polymere

- Biomaterialien spielen bei einer Reihe medizinischer Applikationen eine herausragende Rolle. Unter Biomaterialien versteht man Substanzen, die im menschlichen oder tierischen Körper als Ersatzstoffe für körpereigene Materialien eine bestimmte Funktion übernehmen [Dictionary of Science and Technology (1992)]. Beispiele hierfür sind Metalle oder Polymere, wie man sie z.B. bei Totalendoprothesen im Bereich des Hüftgelenks verwendet. Ein Nachteil vieler Biomaterialien, die nur vorübergehend im Körper eingesetzt werden, wie z. B. Nägel oder Platten im Bereich der Chirurgie besteht darin, daß sie nach der Applikation entfernt werden müssen. Aus diesem Grunde setzte zu Beginn der 70er Jahre die intensive Suche nach bioabbaubaren Materialien ein, die sich während der Applikation in körperverträgliche Bruchstücke abbauen. Unter 'bioabbaubar' versteht man, daß das biologische System, in welches man ein Material bringt, zu dessen Abbau beiträgt [Vert, M. et al. (1992) 73-92]. Besonders hervorzuheben sind bioabbaubare Polymermaterialien, die in Oligomere oder Monomere zerfallen. Als Beispiele für deren Anwendung seien chirurgisches Nahtmaterial [Herrmann, J.B. et al. Arch.Surg.100 (1970) 486-490; Miller, N.D. and Williams, D.F. Biomaterials5 (1984) 365-368] oder abbaubare Arzneistoffträger [Asano, M. et al. Biomaterials10 (1989) 569-573; Fukazaki, H. et al. Biomaterials12 (1991) 433-437] genannt.
- Die erfolgreiche Anwendung bioabbaubarer Polymere hat zu einer intensiven Suche nach neuen synthetischen Materialien geführt, aus der eine Vielzahl verschiedener Polymerklassen resultierte, wie z.B. Poly(α -hydroxyester), Poly(β -hydroxyester), Polyanhydride, Polycyanoacrylate und viele andere [Göpferich, A. (1997) 451-472; Göpferich, A. Biomaterials17 (1996a) 103-114; Göpferich, A. Eur.J.Pharm.Biopharm.42 (1996b) 1-11]. Besonderes Kennzeichen dieser Polymere ist ihre geringe Löslichkeit in wässrigen Medien, die sich erst durch den Polymerkettenabbau, d.h. die Hydrolyse zu niedermolekularen Oligomeren oder Monomeren, verbessert und damit zur Erosion dieser Materialien führt.
- Neben der Entwicklung von synthetischen bioabbaubaren Polymeren setzte gleichzeitig eine intensive Suche nach natürlichen Polymeren ein, die ähnliche Eigen-

schaften besitzen. Beispiele hierfür sind Kollagen, Hyaluronsäure, Alginat und Zellulosederivate [Park, K. et al. Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery (1993)]. Bei diesen Substanzen wird zum Teil in Kauf genommen, daß sie eine erhöhte Wasserlöslichkeit besitzen. Um die Wasserlöslichkeit herabzusetzen, werden

5 natürliche Polymere oft chemisch modifiziert, z.B. durch Veretherungen und Veresterungen funktioneller Gruppen in der Polymerkette oder durch Quervernetzungen einzelner Stränge. Als Beispiel sei hier die Quervernetzung von Kollagen, Gelatine oder Alginat genannt.

Verschiedene bioabbaubare Polymere unterscheiden sich vor allem durch die

10 Geschwindigkeit von Polymerkettenabbau und Erosion. Dies ist für viele Anwendungen von Bedeutung, bei denen sich der Polymerkettenabbau über einen definierten Zeitraum erstrecken muß, wie zum Beispiel bei der Freigabe von Arzneistoffen (s.u.). Von herausragender Bedeutung für synthetische, partialsynthetische und natürliche bioabbaubare Polymere ist die Verträglichkeit mit

15 dem biologischen System, in welches sie eingebracht werden. Für Anwendungen im menschlichen oder tierischen Organismus dürfen einzelne Bauteile, wie z.B. Oligomere oder Monomere nicht toxisch sein und die Polymere dürfen höchstens eine moderate Entzündungsreaktion im Gewebe auslösen [Babensee, J.E. et al. Adv. Drug Delivery Rev. 33 (1998) 111-139].

20 Medizinische und Pharmazeutische Anwendung bioabbaubarer Polymere

Die oben genannten synthetischen, partialsynthetischen und natürlichen bioabbaubaren Polymere finden derzeit Verwendung zur kontrollierten Freigabe von Arzneistoffen (drug delivery) [Göpferich, A. Eur.J.Pharm.Biopharm.42 (1996b) 1-11] und als Träger für Zellen (tissue engineering) [Langer, R. and Vacanti, J.P. Science 260

25 (1993) 920-926]. Im Rahmen des drug delivery geben bioabbaubare Polymere Arzneistoffe durch Diffusion, Erosion, Quellung oder osmotische Effekte kontrolliert frei. Im Bereich des tissue engineering setzt man bioabbaubare Polymere z.B. als poröse "Schwämme" ein, auf denen Zellen adhären, proliferieren und differenziert werden können. Während sich die Zellen zu einem Gewebeverband entwickeln,

30 baut sich der Polymerträger ab und es resultiert ein Gewebe, welches sich in den menschlichen oder tierischen Körper transplantieren läßt [Crane, G.M. et al. Nat.Med. (N.Y.)1 (1995) 1322-1324; Hubbell, J.A. Nature 398 (1999) 198-199;

Niklason, L.E. et al. Science 284 (1999) 489-493]. Beispiele für Gewebe die derzeit auf diese Weise hergestellt werden, sind u.a. Knorpel, Knochen und Gefäße.

Die Anwendung bioabbaubarer Polymere im Bereich des tissue engineering und des drug delivery stellen besondere Anforderungen an diese Materialien.

- 5 Von herausragender Bedeutung ist die Biokompatibilität der Polymere und ihrer Abbauprodukten. Darüber hinaus stellen die Anwendungen besondere Anforderungen an die Oberflächeneigenschaften von bioabbaubaren Polymeren.

Zunächst seien einige Beispiele aus dem Bereich des drug delivery genannt :





- 10
15
1. Man beobachtet häufig die Adsorption von Molekülen (z.B. Arzneistoffe, Proteine und Peptide) an Polymeroberflächen [Göpferich, A. et al. J.Biomed.Mater.Res. (1999)]. Dies kann dazu führen, daß der bioabbaubare Arzneistoffträger seine Dosis nicht im gewünschten Umfang und nicht mit der gewünschten Kinetik freisetzt. Im Extremfall kann dies auch die Inaktivierung des Wirkstoffes zur Folge haben. Die Adsorption von Wirkstoffen ist daher in vielen Fällen unerwünscht.

- 20
2. Die Verträglichkeit eines bioabbaubaren Polymers hängt in hohem Maße von den Oberflächeneigenschaften ab. So werden diese Polymere in Form von Teilchen im Mikrometer- und Nanometerbereich von Zellen des Immunsystems, wie z.B. Makrophagen nach Absorption körpereigener Proteine erkannt und anschließend phagozytiert [Armstrong, T.I. et al. J Drug Targeting 4 (1997) 389-398; Tabata, Y. and Ikada, Y. Biomaterials 9 (1988) 356-362]. Die Kontrolle der Oberflächeneigenschaften kleiner Teilchen als parenterale Arzneiformen ist daher für deren erfolgreichen Einsatz erforderlich.

- 25
30
3. Man versucht seit langem, bioabbaubare Nanopartikel für die gezielte Verabreichung von Substanzen an spezifische Gewebe (z.B. Tumore oder zentrales Nervensystem) einzusetzen (drug targeting) ([Kratz, F. Pharm. Unserer Zeit 24 (1995) 14-26; Kreuter, J. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 19 (1994) 253-256]. Dabei stellte sich heraus, daß die adsorbierten körpereigenen Proteine auf den Partikeloberflächen dafür verantwortlich sind, wohin diese Partikel transportiert werden [Juliano, R.L. Adv. Drug Delivery Rev. 2 (1988) 31-54]. Bisher ist man nur bedingt in der Lage, eine gezielte Adsorption dieser

Proteine an die Partikel zu erreichen. Polymere, welche die gezielte Modifikation ihrer Oberflächen erlauben, sind daher vorteilhaft.

Auch im Bereich des tissue engineering spielen die Oberflächeneigenschaften bioabbaubarer Polymere eine bedeutende Rolle :

- 5 1. Die Wechselwirkungen zwischen Zellen und Polymer entscheiden über Zellwachstum und Zelldifferenzierung [Göpferich, A. et al. J. Biomed. Mater. Res. (1999)]. Verantwortlich für die Anheftung an Polymeroberflächen sind natürliche Verankerungsmechanismen der Zellen. Proteine, wie z.B. Integrine, erlauben es, daß sich Zellen an spezifische Aminosäuresequenzen anheften. Die Anheftung an bioabbaubare Polymere kommt dadurch zustande, daß Proteine aus Körperflüssigkeiten oder Zellkulturmedien unspezifisch an die Polymeroberflächen adsorbieren und sich die Zellen ihrerseits wiederum an Peptidsequenzen der Proteine anheften [Göpferich, A. et al. J. Biomed. Mater. Res. (1999)]. Die unspezifische Adsorption von Proteinen erlaubt es einer Vielzahl verschiedener Zellen sich an die Oberfläche anzuheften. Dies ist vor allem dann unerwünscht, wenn auf dem bioabbaubaren Polymer eine spezifische Zellsorte adhären soll. Die Kontrolle über die Adsorption von Proteinen und Peptiden ist daher erwünscht.
- 10  
- 15 2. Die Aminosäuresequenzen, ^{die} an die Zellen anbinden, sind oft für einen Zelltypus spezifisch, d.h. belegt man die Oberfläche eines Materials mit einer zellspezifischen Sequenz, dann adhärirt bevorzugt ein Zelltyp [Palmer, B.M. and Bizios, R. J. Biomech. Eng. 119 (1997) 159-165].
- 20  
- 25 3. Die Zellmembran trägt eine Reihe von Rezeptoren. Über diese Rezeptoren läßt sich Einfluß nehmen auf das Verhalten von Zellen. Befinden sich entsprechende "Signalstoffe", wie z. B. Hormone, Wachstumsfaktoren oder Zytokine auf der Oberfläche von Polymeren, so läßt sich über diese Oberfläche das Verhalten der daran haftenden Zellen beeinflussen [Saltzman, W.M. MRS Bulletin 21 (1996) 62-65].

Die oben genannten Beispiele zeigen die Bedeutung der Oberflächeneigenschaften

eines bioabbaubaren Polymers für dessen erfolgreiche Applikation. Die Modifizierung der Oberflächeneigenschaften bioabbaubarer Polymere ist seit einigen Jahren Ziel intensiver Forschung. Gegenstand dieser Arbeiten ist einerseits die

5 Suche nach Substanzen, die an der Oberfläche bioabbaubarer Polymere adsorbiert oder chemisch gebunden diese Oberfläche funktionalisieren. Dabei kommt Aminosäuresequenzen, Peptiden und Proteinen eine herausragende Bedeutung zu [Cook, A.D. et al. J.Biomed.Mater.Res.35 (1997) 513-523; Drumheller, P.D. and Hubbell, J.A. Anal.Biochem.222 (1994) 380-388; Patel, N. et al. FASEB J.12 (1998a) 1447-

10 1454]. Andererseits ist man auf der Suche nach bioabbaubaren Materialien und Verfahren, die es auf einfache Weise erlauben, Oberflächen mit Substanzen zu belegen. Die hier offengelegte Erfindung ist in diesem Bereich angesiedelt. Sie grenzt sich deutlich vom Stand der Technik in diesem Bereich ab.

Die ersten Ansätze zur Herstellung bioabbaubarer Polymere mit modifizierbaren

15 Oberflächen gingen davon aus, in die Polymerkette von Poly(α -hydroxyestern), wie z.B. Polylactid, Monomere einzubauen, wie z.B. Lysin, die eine funktionelle Gruppe enthalten, an die sich Moleküle anheften lassen [Barrera, D.A. (1993)]. Ein Nachteil dieser Polymere besteht darin, daß die Aminogruppen in der Oberfläche nur schwer zugänglich sind. Um dies zu verbessern, wurden an diese Aminogruppen Oligo-

20 peptide angeheftet, damit das Knüpfen neuer chemischer Bindungen erleichtert wird. Ein Nachteil dieses Vorgehens besteht darin, daß solche Verbindungen die unspezifische Adsorption fremder Proteine und Peptide nicht unterdrücken. Dies führte zu neuen Entwicklungen, bei denen man ein breiter anwendbares System erhielt [Patel, N. et al. 25 (1998b) 109-110]. Dabei macht man sich die Bindung von

25 Biotin an das Protein Avidin zunutze, die sehr spezifisch ist. Man verankert Biotin auf einer Polymeroberfläche und bindet an die Substanz, mit der man die Oberfläche belegen will ebenfalls Biotin. In Gegenwart von Avidin, welches mehrere Bindungsstellen für Biotin besitzt, kommt es dann zur gezielten Anheftung der biotinylierten Verbindung an die Oberfläche. Ein Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß sich

30 auf einer Polymeroberfläche u.a. Muster erzeugen lassen. Dies hat Bedeutung für Gewebe, bei denen eine strukturierte Anordnung von Zellen erforderlich ist. Der Nachteil des Verfahrens besteht darin, daß man über die Verankerung von Avidin ein Protein verwendet, welches körperfremd ist und somit zu unerwünschten

Reaktionen führen kann. Zusätzlich erfordert es die Biotinylierung der zu verankernden Substanz, was das Verfahren kompliziert und damit die Anwendbarkeit einschränkt. Gleichzeitig ist die Oberfläche mit Avidin belegt, was für viele Anwendungen unerwünscht sein kann.

- 5 Andere Methoden verwenden zur Anheftung oberflächenmodifizierender Substanzen Polymere. So wird zum Beispiel Polyethylenglykol an die zu modifizierende Oberfläche angeheftet, was die entsprechende Existenz funktioneller Gruppen auf den Oberflächen voraussetzt [Cima, L.G. et al. US5906828 (1999)]. Diese funktionellen Gruppen müssen bei diesen Entwicklungen zum Teil durch chemische
- 10 Reaktionen erst erzeugt werden. Dies ist ein zusätzlicher Verfahrensschritt und macht das Verfahren ebenfalls schwerlich universell anwendbar [Cima, L.G. et al. US5906828 (1999)]. Als Patent angemeldet ist die Verankerung von speziellen Peptidsequenzen auf Keramiken, Polyhydroxyethylmethacrylat und Polyethylenterephthalat [Hubbell, J.A. et al. US5330911 (1994)]. Das Verfahren
- 15 setzt die Existenz funktioneller Gruppen voraus und ist nicht dazu geeignet, unspezifische Adsorption zu unterdrücken. Ein weiteres Verfahren stützt sich auf Polyalkylimine als "spacer" zwischen Oberfläche und modifizierender Substanz [Cahalan, P.T. et al. US5308641 (1994)]. Das Verfahren hat die gleichen Nachteile wie [Hubbell, J.A. et al. US5330911 (1994)] und setzt die Existenz funktioneller
- 20 Gruppen auf der Polymeroberfläche voraus. In [Drumheller, P.D. US5897955 (1999)] und [Cook, A.D. and Drumheller, P.D. WO9746267A1 (1997)] wird die zu modifizierende Oberfläche zunächst mit einem Tensid belegt welches dann erst nach Quervernetzung die eigentliche Oberfläche bildet, an die Substanzen gebunden werden können. Auch hier ergibt sich der Nachteil, daß die Oberfläche
- 25 damit nicht maskiert ist. Verfahren zur Erhöhung der Kompatibilität von Oberflächen binden asymmetrische Moleküle über radikalische Mechanismen an Oberflächen. Das Verfahren ist dadurch an spezifische Materialien gebunden, die zunächst an der Polymeroberfläche adsorbieren und sich anschließend quervernetzen lassen. In [Guire, P.E. US5263992 (1993)] wird die Oberfläche von Biomaterialien zunächst mit
- 30 einem Verbindungsmolekül in einer radikalischen Reaktion überzogen, wobei das Verbindungsmolekül eine funktionelle Gruppe trägt; an die oberflächenmodifizierende Substanzen gebunden werden. Nachteil des Verfahrens besteht darin, daß die passive Adsorption von Substanzen durch diesen Aufbau nicht unterdrückt

wird. In [Camble, R. et al. US5320840 (1994)] wird ein Polymer beschrieben, welches wasserlöslich ist und damit nicht den Anforderungen an eine feste wasserunlösliche bioabbaubare Matrix genügt. Viele Verfahren, wie z.B. das in [Matsuda, T. et al. US5240747 (1993)] beschriebene, erfordern zur Modifizierung von Polymeroberflächen drastische Bedingungen, wie z.B. die Bestrahlung mit UV Licht oder die Präsenz funktioneller Gruppen in Form von Aminogruppen oder Polyaminen [Barrera, D.A. et al. US5399665 (1995);Larm, K.O. et al. US5049403 (1991)]. Einige Patente im Bereich der Oberflächenmodifizierung von Polymeren greifen auf Moleküle zurück, die zwei funktionelle Gruppen tragen [Guire, P.E. US5263992 (1993)]: eine zur Bindung an das Polymer und eine zur Bindung der eigentlichen oberflächenmodifizierenden Substanz. Nachteil des Verfahrens ist die eingeschränkte Auswahl an Polymeren und Bindungsmolekülen, die im Bereich der Biomaterialien eingesetzt werden können und die drastischen Reaktionsbedingungen, die nicht ohne Einfluß auf die Form einer Polymermatrix bleiben.

Die oben dargelegten Beispiele zeigen den Bedarf an bioabbaubaren Polymeren, die folgende Eigenschaften besitzen:

1. Unterdrückung unspezifischer Adsorption von Substanzen, wie z.B. Arzneistoffen, Aminosäuren, Proteinen, Peptiden,
2. Unterdrückung der unspezifischen Adhäsion von lebenden Zellen,
3. Vollständige Bioabbaubarkeit und Bioverträglichkeit der Abbauprodukte,
4. Eine einstellbare Dichte funktioneller Gruppen, die für die chemische Reaktion mit einer Vielzahl oberflächenmodifizierender Substanzen geeignet sind,
5. Gleichzeitige Belegung der Oberfläche mit mehreren verschiedenen Substanzen soll möglich sein,
6. Die Polymere sollen die Möglichkeit bieten, vor oder nach der Verarbeitung in spezifische Formkörper (z.B. Filme, poröse Schwämme, Mikropartikel, Nanopartikel, Mizellen) eine Bindung der oberflächenmodifizierenden Substanzen zu erlauben,
7. Die Erzeugung von Mustern durch Bindung oberflächenmodifizierender Moleküle auf der Oberfläche soll möglich sein.

Derzeit gibt es kein Material, welches diese Anforderung erfüllt. Es sind lediglich Systeme bekannt, die Teilanforderungen gerecht werden. Ein System, von dem sich der Gegenstand der Erfindung ableitet, sind bioabbaubare Diblock-Copolymere aus Polyethylenglykol-monomethylether (MeO.PEG) und Polylactid (PLA) [Burkersroda, F. et al. Biomaterials 18 (1998) 1599-1607; Göpferich, A. et al. (1994) 242-277; Gref, R. et al. Science 263 (1994) 1600-1603]. Bei MeO.PEG ist eine Hydroxylgruppe des PEG durch eine Methoxygruppe ersetzt, was bei der Synthese von MeO.PEG-PLA dazu führt, daß keine Triblock-copolymere gebildet werden. Durch ihren hydrophilen Charakter und ihre Orientierung an der Grenzfläche zum wässrigen Medium sorgen die MeO.PEG Ketten für eine effektive Unterdrückung der Adsorption von Substanzen und für eine effektive Unterdrückung der Adhäsion von Zellen [Göpferich, A. et al. J. Biomed. Mater. Res. (1999)]. Nachteil dieser Polymere besteht darin, daß die chemische Bindung von Molekülen an die Oberfläche durch die im Gegensatz zur freien Hydroxylgruppe in Poly(ethylenglykol) inerte Methoxygruppe des MeO.PEG chemisch nahezu unmöglich ist.

Beschreibung der Erfindung

Allgemeine Eigenschaften

Gegenstand der Erfindung sind Polymere, bei denen ein Teil der Kette aus der Oberfläche herausragt und die Bindung oberflächenmodifizierender Substanzen erlaubt. Dadurch lassen sich spezielle Oberflächen konstruieren und bestmöglich für solche Anwendungen präparieren, bei denen die Oberfläche der Materialien dazu dient, eine bestimmte Funktionalität zu übernehmen. Gleichzeitig sorgen die entwickelten Polymere für eine Unterdrückung der unspezifischen Adsorption von Molekülen und Adhäsion von Zellen an ihrer Oberfläche. Potentielle Einsatzgebiete dieser Polymere sind die Herstellung von Arzneistoffträgern (Implantate, Mikropartikel, Nanopartikel), die gezielte Steuerung der Wirkstoffverteilung im tierischen oder menschlichen Körper (drug targeting), Gewebezüchtung in vitro (tissue engineering) und Bereiche, in denen es notwendig ist, eine oder mehrere oberflächenmodifizierende Substanzen an einer Polymeroberfläche zu verankern (z.B. Farbstoffe, molekulare Sensoren, etc.). Bei diesen Anwendungen ist es

entscheidend, daß sich auf der Oberfläche eines Materials andere Moleküle chemisch kovalent binden lassen, um diese Oberflächen dauerhaft zu modifizieren. Diese Modifizierung läßt sich an verschiedenen Formkörpern vornehmen, wie z.B. Filmen, Mikro- und Nanopartikeln oder Schwämmen. Dabei ist es möglich, eine räumlich geordnete Verteilung von Substanzen auf den Oberflächen zu erzeugen (Muster oder unterschiedliche Belegungsdichte). Eine wichtige Eigenschaft der hier beschriebenen Polymere ist die vollständige Biokompatibilität der verwendeten Molekülteile. Hierin besteht auch ein Vorteil dieser Polymere im Vergleich zu bereits beschriebenen Systemen zur Modifizierung von Oberflächen, die z.B. auf Polystyrol, Glas oder Metalle zurückgreifen [Mikulec, L.J. and Puleo, D.A. J.Biomed.Mater.Res.32 (1996) 203-208; Puleo, D.A. J.Biomed.Mater.Res.29 (1995) 951-957; Puleo, D.A. Biomaterials17 (1996) 217-222; Puleo, D.A. J.Biomed.Mater.Res.37 (1997) 222-228]. Im Gegensatz zu den genannten Materialien haben diese Polymere das Potential sich nach Implantation in den menschlichen oder tierischen Körper je nach Bedarf in einer bestimmten Zeit zu zersetzen und den Körper zu verlassen. Ein herausragender Vorteil der nachfolgend beschriebenen Polymere ist ihre Oberflächenstruktur, die es gestattet, mit einer Fülle von bekannten Methoden Oberflächen chemisch zu modifizieren [Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996)]. Damit erschließen die Polymere Anwendungen, bei denen es erforderlich ist, Oberflächen von Substanzen zu modifizieren, damit sie für den Einsatz im menschlichen oder tierischen Körper besser geeignet sind und die Träger zudem nicht entfernt werden müssen.

Beschreibung der neu entwickelten Polymere

Um an Polymeroberflächen oberflächenmodifizierende Substanzen dauerhaft zu verankern, sind zwei Voraussetzungen zu erfüllen:

1. Die Polymere müssen an ihrer Oberfläche funktionelle Gruppen tragen, an denen sich Substanzen chemisch binden lassen. Beispiele für solche Gruppen sind u.a. Aminogruppen, Thiole, Alkohole, Carbonsäuregruppen, Ketogruppen.
2. Die funktionellen Gruppen müssen für diese chemischen Reaktionen gut zugänglich sein, was durch einen ausreichenden Abstand von funktioneller Gruppe und Polymeroberfläche erreicht wird.

Bekannte bioabbaubare Polymere, wie Poly(α -hydroxy ester) [z.B. Poly(laktid), Poly(laktid-co-glykolid)], Polyanhydride oder Poly(β -hydroxy ester) [Handbook of biodegradable Polymers(1997) 451-472], besitzen zwar geeignete funktionelle Gruppen an beiden Molekülen, allerdings sind diese Gruppen an der Oberfläche nur schwer zugänglich. Poly(laktid) hat beispielsweise eine Alkohol- und eine Carbonsäurefunktion als Endgruppe, die allerdings aus oben genannten Gründen eine Anbindung an die Polymeroberfläche nicht erlauben. Um diese Probleme zu umgehen, wurden zusammengesetzte Polymere entwickelt, die es aufgrund ihrer Oberflächenstruktur erlauben, eine reaktive Gruppe für eine chemische Reaktion verfügbar zu machen. Dazu wurden Polymere synthetisiert, die aus einem bioabbaubaren und vorzugsweise lipophilen Strang und einem nicht biabbaubaren (bzw. langsamer bioabbaubaren) Strang bestehen. Der nicht abbaubare Strang besitzt hydrophile Eigenschaften, die z.B. bei Kontakt des Polymers mit Wasser dafür sorgen, daß er auf der Polymeroberfläche angereichert vorliegt und z.B. durch eine funktionelle Endgruppe die chemische Bindung von Molekülen ermöglicht. Durch die Zusammensetzung des Polymers, d.h. die Art und Länge der abbaubaren und der nicht abbaubaren Polymerkette lassen sich die Materialeigenschaften des Polymers festlegen. Beispielsweise kann man über die Länge bzw. Struktur des hydrophilen Molekülteils die Beweglichkeit der fixierten Substanz variieren. Über die Länge und Struktur des bioabbaubaren und vorzugsweise lipophilen Polymers sind die Abbaueigenschaften und die mechanische Festigkeit des Copolymers steuerbar.

Abbaubare Polymerblöcke

Der abbaubare Polymerteil kann aus den bekannten oben beschriebenen bioabbaubaren Polymeren, wie zum Beispiel Poly(α -hydroxy ester) [z.B. Poly(laktid), Poly(laktid-co-glykolid)], Polyanhydride oder Poly(β -hydroxy ester) bestehen. Weitere Verbindungen sind in der Literatur beschrieben [Handbook of biodegradable Polymers (1997) 451-472]. Die minimale Kettenlänge n , gemessen in Monomeren, beträgt dabei $n=2$, die Obergrenze ergibt sich aus den für die Polymerisationsreaktion maximal erreichbaren Molmassen. Die Länge der abbaubaren Polymerkette entscheidet über die Eigenschaften des Polymers. Im Falle der Kombination von Poly(D,L-lactid) (PLA) und Poly(ethylenglykol) (PEG) als nichtabbaubarem Block führt eine Kettenlänge von ca. $n < 20$ zu wasserlöslichen

Produkten. Ist der PEG Gehalt größer als der PLA Gehalt, dann kann ebenfalls mit wasserlöslichen Produkten gerechnet werden.

Nichtabbaubare (bzw. langsam abbaubare) Polymerblöcke

- Als nichtabbaubare hydrophile Blöcke eignen sich z.B. Polyethylenglycol (PEG) (als lineares, kamm- und sternförmiges Polymer), Poly(vinylalkohol), Polysaccharide, Peptide und Proteine. Vor allem PEG verfügt dabei über den Vorteil, daß es die Oberfläche gegen die Adsorption von Molekülen und die Adhäsion von Zellen maskiert. Ein Nachteil zum Beispiel des PEG besteht allerdings darin, daß es sich um ein symmetrisches Molekül handelt. Dies kann bei der Verknüpfung mit bioabbaubaren Polymeren von Nachteil sein, da immer mit der Kombination von zwei abbaubaren Polymerketten pro PEG Strang zu rechnen ist und damit die funktionelle Endgruppe des PEG für die Oberflächenmodifikation nicht mehr zur Verfügung steht. Um dieses Problem zu umgehen wird für die Synthese vorzugsweise PEG mit zwei unterschiedlichen funktionellen Endgruppen wie zum Beispiel Poly(ethylenglykol)-amin (PEG-NH₂) verwendet, bei dem die endständige Hydroxylgruppe durch eine primäre Aminogruppe ersetzt wurde. Dies gestattet es im Rahmen der Synthese die Anheftung der Monomere des bioabbaubaren Blocks so zu steuern, daß die chemische Reaktion nur an einem Molekülende abläuft. Die Art der funktionellen Endgruppen ist dabei nicht auf Hydroxylgruppe und Aminogruppe beschränkt. Alternativ lassen sich Thiolgruppen, Doppelbindungen oder Carbonylfunktionen für die Synthese einsetzen. Weitere funktionelle Gruppen können der Literatur entnommen werden. Die minimale Kettenlänge des PEG bzw. des asymmetrischen substituierten PEG wie z.B. PEG-NH₂ liegt bei einer Ethyleneinheit (Ethanolamin). Für die Anwendung im menschlichen und tierischen Körper liegen optimale Molmassen bei bis zu 20kD, um die Exkretion des Polyethylenglykols durch die Niere im menschlichen und tierischen Organismus zu gewährleisten [Herold, D.A. et al. Biochem.Pharmacol.38 (1989) 73-76].

Synthese der Blockcopolymere aus bioabbaubarem und nicht- bzw. langsam bioabbaubarem Block

- Die Synthese der Blockcopolymere läßt sich prinzipiell auf verschiedenen Wegen bewerkstelligen. Zum einen können beide Blöcke separat synthetisiert und anschließend kovalent gebunden werden. Alternativ dazu ist es möglich eine

Polymerkette vorzulegen und die fehlende Kette durch Polymerisation an einem Polymerkettenende zu synthetisieren. So ist es zum Beispiel möglich, Blockcopolymere aus Poly(D,L-lactid) und Poly(ethylenglykol)-amin (PLA-PEG-NH₂) zu synthetisieren, indem man PEG-NH₂ vorlegt und die bioabbaubare PLA Kette durch Ringöffnungspolymerisation aus Dilaktid am Hydroxyende des PEG-NH₂ synthetisiert. Prinzipiell ist auch die umgekehrte Vorgehensweise möglich. Über die im Anschluß stattfindende Anheftung der oberflächenmodifizierenden Substanz an den hydrophilen Molekülteil kann dann die gewünschte Oberflächeneigenschaft eingestellt werden.

10 Aktivierung der freien funktionellen Gruppe am hydrophilen Polymerende

Das Blockcopolymer ist über die freie funktionelle Gruppe in der Lage, direkte Bindungen mit anderen Molekülen einzugehen, sofern diese chemisch reaktiv sind, da sie z.B. über eine aktivierte Carbonsäure verfügen. Weitere reaktive Gruppen finden sich in der chemischen Literatur [Hermanson, G.T.: Bioconjugate Techniques (1996)]. Umgekehrt läßt sich das Blockcopolymer für die Reaktion mit nukleophilen Gruppen modifizieren, indem man ein bifunktionelles Molekül, wie zum Beispiel Disuccinimidylsuccinat, an die freie Endgruppe des hydrophilen Blocks gekoppelt wird. Diese Reaktion kann im einfachsten Fall in Lösung stattfinden. Im Falle von PLA-PEG-NH₂ eignet sich z.B. DMSO als Lösungsmittel. Die Reaktion kann allerdings auch nach der Verarbeitung des Polymers an dessen Oberfläche stattfinden. Der Vorteil der Aktivierung besteht darin, daß die Kopplung von vielen Substraten in Wasser abläuft. Durch das dritte Molekül, welches an den hydrophilen Block geknüpft wird, endet dieser Block mit einer aktiven Gruppe, die in der Lage ist, andere Moleküle mit nukleophilen funktionellen Gruppen, wie zum Beispiel Aminogruppen zu binden. Abbildung 1 stellt die Anheftung einer oberflächenmodifizierenden Substanz an eine solche Polymeroberfläche schematisch dar.

Chemische Variabilität der entwickelten Polymere

Gegenstand der Erfindung ist damit ein Polymer, das sich - wie in Abbildung 2 gezeigt - aus drei Bauteilen zusammensetzt:

- 30 • Wasserunlöslicher, bioabbaubarer und biokompatibler Molekülteil mit variabler Kettenlänge, der als "Träger" dient und die Fixierung des gesamten

Polymers bewerkstelligt (zum Beispiel bestehend aus Poly(α -hydroxyestern)

(z.B. Polymilchsäure, Polyglykolsäure und deren Copolymeren), Poly(ϵ -Caprolacton), Poly(β -hydroxyestern) (wie z.B. Poly(β -Hydroxybutyrat), Poly(β -Hydroxyvalerat)), Poly(dioxanon), Polyäpfelsäure, Polyweinsäure, Polyortho-
5 ester, Polycarbonate, Peptide, Polysaccharide, Proteine u.a. natürliche Polymere [Göpferich, A. (1997) 451-472; Göpferich, A. Biomaterials 17 (1996a) 103-114; Göpferich, A. Eur.J.Pharm.Biopharm. 42 (1996b) 1-11; Leenslag, J.W. et al. Biomaterials 8 (1987) 311-314; Park, K. et al. Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery (1993); Suggs, L.J. and Mikos, A.G. (1996) 615-624]]. Weitere Polymere können der Literatur entnommen
10 werden. Die Kettenlänge der Polymere bewegt sich von wenigen bis zu mehreren tausend Monomereinheiten, so daß Polymere mit Molekulargewichten von über 10 Mio. Dalton denkbar sind. Strukturvariationen in Form von z.B. Kammpolymeren, Sternpolymeren oder
15 quervernetzbaaren Verbindungen ergeben sich aus der Literatur über die Synthese solcher abbaubarer Polymere. Es eignen sich bioabbaubare Polymere deren Polymerkettenabbau durch Hydrolyse, enzymatische-
photolytische- oder andere Reaktionen herbeigeführt werden kann.

- Hydrophiler, nicht- oder langsam bioabbaubarer Molekülteil mit ebenfalls
20 variabler Kettenlänge, der dazu dient, eine oder mehrere funktionelle Gruppen 'verfügbar zu machen' (bestehend aus bifunktionalen, linearen und wasserlöslichen Bausteinen: z.B. Polyethylenglykolaminen, Polyethylenglykolsäuren oder Polyethylenglykol mit endständigen Epoxygruppen mit variabler Molekülgröße, sternförmige oder verzweigte
25 Polyethylenglykole, Polyacrylamide, Polyvinylalkohol, Polysaccharide (z.B. modifizierte Cellulosen und Stärken), Alginate, Peptide, Proteine, u.a.). Die Kettenlänge dieses Molekülteils ist zum einen nach unten beschränkt auf eine Monomereinheit (z.B. Ethanolamin bei den Polyethylenglykolaminen) und nach oben begrenzt durch die Voraussetzung, daß die freigesetzten
30 Bruchstücke noch nierengängig sind und ausgeschieden werden können, sofern es sich nicht um ein bioabbaubares, hydrophiles Polymer handelt. Mögliche bifunktionale Derivate sind zum Beispiel, wie oben erwähnt Polyethylenglykole mit Hydroxylgruppe und Aminogruppe [Yokoyama, M. et

al. Bioconjug.Chem.3 (1992) 275-276] bzw. Hydroxylgruppe und Carbonsäuregruppe [Zalipsky, S. and Barany, G. J.Bioact.Compat.Polym.5 (1990) 227-231]. Diese Funktionalität muß dann auf andere Polymere übertragen werden, die dann ebenfalls Bifunktionalität im Molekül tragen sollten.

◦ „Bindeglied“ zum Beispiel aus :

➤ einer einzelnen funktionellen Gruppe (z.B. Aminogruppe, Carboxylgruppe) und damit direkter Aktivierung des hydrophilen Polymers (z.B. aktivierte Säurefunktion oder Epoxid);

➤ physiologischen Dicarbonsäuren (Bernsteinsäure, Weinsäure und Abwandlungen davon [Anderson, G.W. et al. J.Am.Chem.Soc.86 (1964) 1839-1842]), die mit Abgangsgruppen (Succinimidylestern) versehen sind, um die Bildung einer bzw. zweier Säureamidgruppierungen zu erreichen;

➤ Dialdehyden (z.B. Glutardialdehyd);

➤ Speziellen Molekülen für selektive Bindung von Thiolen [Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996)] :
z.B. N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) oder Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat (SMCC);

➤ Photoreaktiven Crosslinkern [Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996)] :
z.B. N-Hydroxysuccinimidyl-4-azidosalicylsäure (NHS-ASA)
Sulfosuccinimidyl-2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionat (SASD);

➤ Spaltbaren Crosslinkern [Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques (1996)] :

Verbindungen aus den oben genannten Gruppen, die sich durch spezielle Reagenzien spalten lassen :

Disulfide durch Hydrogenolyse oder durch Disulfidaustausch,

Glykolgruppen mit Periodat (z.B. bei der Weinsäure);

Estergruppen mit Hydroxylamin.

Neue Anwendungen im Rahmen der Erfindung

Das in Abbildung 3 dargestellte Polymer ist in der Lage, weitere Moleküle zu binden. Dies kann wiederum in Lösung geschehen oder an der Oberfläche. Voraussetzung dafür ist die Existenz einer frei zugänglichen funktionellen Gruppe beim Substrat (wie z.B. eine Aminogruppe). Entscheidender Vorteil dabei ist, daß die Kopplungsreaktionen unter sehr milden Bedingungen auch im wässrigen Medium durchführbar sind und damit auch empfindliche Substanzen in Betracht kommen.

So kann man Proteine bei Raumtemperatur und bei einem für das Protein geeigneten pH ohne Denaturierung an der Oberfläche fixieren. Oder man kann Substanzen, die mittels Bestrahlung von Licht an die Oberfläche gebunden werden sollen, in einem beliebigen Lösungsmittel lösen, in welchem das Polymer unlöslich ist. Bei anschließender Bestrahlung mit UV-Licht kann dann die Bindung an die Oberfläche ebenfalls bei Raumtemperatur geknüpft werden. Für eine Anknüpfung sind also prinzipiell mehrere Bedingungen denkbar, wobei genügend Freiheiten bestehen, in Bezug auf die Stabilität der Substanz und des Polymers optimale Bedingungen zu wählen. Ein weiterer Vorteil ist die Biokompatibilität der Einzelbausteine, die einen unbedenklichen Einsatz im menschlichen Körper überhaupt erst möglich macht. Mit einfacher Art der Ankopplung der unveränderten Wirksubstanz an das aktive Polymer kann das Verfahren soweit vereinfacht werden, daß es nur nötig ist, den fertig vorgeformten Polymerträger (z.B. Mizellen, Nanopartikel, Polymerfilm oder Polymerschwamm) in die Lösung der Wirksubstanz zu tauchen, um dann nach einer vorgegebenen Reaktionszeit das fertig modifizierte System zu erhalten.

Substanzen, die für eine Bindung verwendbar sind, sind im allgemeinen solche, die eine nukleophile Gruppe – beispielsweise eine Aminogruppe – tragen, wie zum Beispiel :

- Peptide
- Proteine
- Aminosäuren
- Arzneistoffe
- Antikörper
- Enzyme

- DNA / RNA
- Farbstoffe
- Molekulare Sensoren

Alternativ zur beschriebenen Anbindung der Substanz an das Polymer ist aber auch
5 der umgekehrte Weg denkbar, nämlich zuerst die anzubindende Substanz für eine
Bindung zu aktivieren, um dann bei Zugabe an das Polymer zu binden. Die so
erhaltenen Polymer-Substrat-Kombinationen unterscheiden sich in ihrer Zusammen-
setzung nicht von den auf dem umgekehrten Aktivierungsweg erhaltenen Polymeren,
allerdings bieten sie unter Umständen aber den Vorteil, daß sie keine reaktiven
10 Gruppen im Inneren tragen, und daher andere Bulkigenschaften besitzen.

Hierbei geht allerdings auch der Vorteil der leichten Herstellungsmethode ge-
koppelter Proteine verloren, da für eine Aktivierung der Wirksubstanzen in aller
Regel ein größerer Überschuß der niedermolekularen Dicarbonsäure erforderlich ist,
um die Bildung von Dimeren zu verhindern. Dieser muß jedoch nach der Aktivierung
15 wieder entfernt werden. Das hat zur Folge, daß sich vor allem bei ebenfalls
niedermolekularen Wirksubstanzen die Aufreinigung schwieriger gestaltet.

Zusätzlich zur Herstellung von homogen belegten Oberflächen sind mit diesen
Polymeren auch nicht-homogen belegte Flächen einfach herzustellen. Das bedeutet,
daß man beispielsweise Gradienten oder Muster (pattern) der oberflächenmodi-
fizierenden Substanzen auf diesen Polymeren erzeugen kann. Das kann durch
20 punktuell Aufbringen der Substanzen (z.B. mit einem Tintenstrahlverfahren) oder
aber durch punktuelle Aktivierung der reaktiven Gruppen durch Bestrahlung (z.B. mit
UV-Licht) geschehen. So können strukturierte Oberflächen geschaffen werden, die
es auch erlauben, beliebige Kombinationen von Substanzen zum Beispiel auf ihre
25 Wirkung auf Zellen zu untersuchen bzw. um Kombinationen von Zellen in ganz
spezieller räumlicher Orientierung zueinander zu züchten oder aber auch um mit
Enzymen biotechnologische Miniaturfabriken zu konstruieren, die in einem
gekoppelten Verfahren spezielle Reaktionen durchführen. In Abbildung 3 sind
solche Oberflächen dargestellt, die sich durch zwei unterschiedliche Substanzen
30 und zudem noch einer inerten kürzeren Komponente auszeichnen.

Im Rahmen des tissue engineering ist es möglich die Adhäsion, Proliferation und
Differenzierung von Zellen besser als bisher zu beeinflussen, da durch die Art der

Verarbeitung eine exakte Belegung der Oberfläche mit einem oder mehreren Substraten möglich ist. Gleichzeitig wird die unspezifische Wechselwirkung von Zellen mit den Polymeroberflächen unterdrückt. Beispiele für Substanzen, die sich zur Oberflächenmodifikation einsetzen lassen sind Peptide (z.B. solche mit dem

5 Motiv -RGD-) und Proteine (z.B. Wachstumsfaktoren, Proteine und Glykoproteine der extrazellulären Matrix). Weitere Substanzen sind in der einschlägigen Literatur beschrieben.

Im Rahmen des drug delivery ist es möglich die Polymere zur Oberflächenmodifizierung einzusetzen, welche kleine Polymerpartikel an spezifische

10 Gewebe oder Organe verteilt (drug targeting). Dies wird durch Bindung von spezifischen Substanzen wie z.B. Plasmaproteinen erreicht. Weitere Substrate sind in der einschlägigen Literatur beschrieben sind. Eine weitere Anwendung besteht in der chemischen Bindung der Polymere in Form von Partikeln an Gewebe (bioadhäsive Systeme). Durch diese Anwendung kann ein Wirkstoff in erhöhter

15 Konzentration an das Zielgewebe verteilt werden.

Durch den Polymerabbau ist zu erwarten, daß die am hydrophilen Polymerblock angeheftete Substanz im Rahmen der Hydrolyse freigesetzt wird. Dieser dynamische Vorgang gestattet die zeitlich gesteuerte Veränderung der Oberflächeneigenschaften des Polymers.

20 Die Polymere lassen sich auch zu diagnostischen Zwecken einsetzen, indem auf ihrer Oberfläche Substanzen gebunden werden, die mit den zu analysierenden Molekülen eine Bindung eingehen. Das Analysat kann dann zusammen mit dem Polymer (z.B. über einen geeigneten Formkörper) von der Probe abgetrennt werden.

Im Folgenden ist die Herstellung eines aktivierten Polymers und die anschließende

25 Anbindung eines Proteins am Beispiel des PEG-PLAs dargestellt.

Syntheseablauf am Beispiel eines reaktiven PEG-PLA Derivats :

Reaktionsablauf Synthese NH_2PEG [Yokoyama, M. et al. Bioconjug.Chem.3 (1992) 275-276] (Abbildung 4)

- Die gewünschte Menge Ethylenoxid wird bei -79°C (Trockeneis + Methanolbad) in getrocknetes THF in einem Dreihalskolben eingeleitet und darin gelöst. Die Ethylenoxidflasche wird nach dem Einleiten zurückgewogen und damit die vorgelegte Menge Ethylenoxid bestimmt. Entsprechend des gewünschten Molekulargewichts des Polymers wird nun die berechnete Menge 0,5M Lösung von Kaliumbis-(trimethylsilyl)-amid in Toluol aus einem Tropftrichter zugegeben.
- 5 Das Reaktionsgemisch wird dann bei 20°C in dem verschlossenen Dreihalskolben 36 Stunden gerührt. Die so erhaltene Polymerlösung wird in die 12fache Menge an Ether getropft und das gefällte Polymer daraus abfiltriert. Nach Auflösen des erhaltenen Polymers in THF wird eine kleine Menge 0,1N Salzsäure zugegeben und damit das Silylamid gespalten. Die so erhaltene Lösung des fertigen Endprodukts
- 15 wird 5 Min bei Raumtemperatur gerührt und erneut in Ether gegeben, um das reine Polymer zu präzipitieren.

Reaktionsablauf Synthese $\text{NH}_2\text{PEG-PLA}$ [Kricheldorf, H.R. and Kreiser-Saunders, I. Macromol.Symp.103 (1996) 85-102; Leenslag, J.W. and Pennings, A.J. Makromol.Chem.188 (1987) 1809-1814] (Abbildung 5):

- 20 Die Ausgangsprodukte der Synthese, das synthetisierte $\text{NH}_2\text{-PEG}$ und cyclisches DL-Dilactid (3,6-Dimethyl-1,4-dioxan-2,5-dion), werden in den gewünschten Gewichtsverhältnissen in je einen Rundkolben gegeben und in Toluol p.A. aufgelöst. Dazu werden beide Kolben am Wasserabscheider erhitzt, um das noch im Toluol vorhandene Wasser zu entfernen. Die so erhaltenen Lösungen werden dann im
- 25 Dreihalskolben vereinigt und unter permanentem Stickstoffstrom erneut erhitzt. Zu dem siedendem Reaktionsgemisch wird dann der abgewogene Katalysator (Zinn-2-ethylhexanoat) gegeben und dann das Gemisch 8 Stunden am Sieden gehalten.
- Die so erhaltene Polymerlösung wird nach dem Abkühlen in einen Rundkolben überführt und dreimal mit Dichlormethan am Rotationsverdampfer bis zur Trockene abrotiert. Nach zweimaligem Abrotieren nach Zugabe von Aceton wird das so
- 30 erhaltene Polymer erneut in Aceton gelöst und in eisgekühltes demineralisiertes Wasser eingetopft und dadurch gefällt. Die so erhaltenen Polymerfäden werden

durch ein Filter abgetrennt und zum Trocknen in einen Vakuumtrockenschrank gegeben. Die Bestimmung der Molekülmasse kann durch GPC erfolgen.

Reaktionsablauf Synthese DSWS [Anderson, G.W. et al. J.Am.Chem.Soc.86 (1964) 1839-1842] (Abbildung 6):

- 5 Die berechneten Mengen Weinsäure und N-Hydroxysuccinimid werden in einem Rundkolben in einer Mischung aus Dioxan und Ethylacetat (4:1) gelöst. Zu dieser Lösung wird die Lösung des Katalysators (Dicyclohexylcarbodiimid) im gleichen Lösungsmittelgemisch gegeben und das Ganze bei 0°C 20h im Eisbad gerührt. Der so erhaltene Niederschlag wird abfiltriert und mit Dioxan gewaschen. Aus diesem
- 10 Niederschlag wird das Endprodukt durch vorsichtiges Erwärmen mit Acetonitril extrahiert. Die so erhaltene Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und das Produkt im Vakuumschrank getrocknet.

Reaktionsablauf Synthese SWS-NH-PEG-PLA (Abbildung 7):

- 15 Die erhaltenen Ausgangsprodukte Disuccinimidylweinsäure und NH₂PEG-PLA werden mit einem leichten Überschuß des Diesters in Acetonitril gelöst und mit einigen Tropfen Triethylamin versehen. Nach kurzem Erhitzen zum Sieden wird die Mischung für 24h gerührt. Das Endprodukt wird durch Abrotieren vom Acetonitril getrennt und in Aceton aufgelöst. Die so erhaltene Polymerlösung wird in Wasser eingetropft und der Niederschlag abfiltriert. Nach Trocknen im Vakuum steht das
- 20 fertige aktive Polymer zur Verfügung.

Anknüpfung der oberflächenmodifizierenden Substanzen [Hill, M. et al. FEBS Lett.102 (1979) 282-286; Schulman, L.H. et al. Nucleic.Acids.Res.9 (1981) 1203-1217](Abbildung 8):

- 25 Die sich nun anschließende Anknüpfung der oberflächenmodifizierenden Substanzen kann nun auf zwei Weisen geschehen. Zum einen ist es möglich, die Substanz und das Polymer in Lösung zu verbinden, wenn die Substanz die nachfolgenden Verarbeitungsschritte unbeschadet übersteht. Oder zum anderen kann erst das Polymer in die gewünschte Form verarbeitet werden und dann erst die Substanz angeknüpft werden. In beiden Fällen ist es ratsam, durch Pufferung
- 30 sicherzustellen, daß z.B. eine Aminogruppe unprotoniert vorliegt, um möglichst quantitative Ausbeuten zu erhalten. Mit einer Pufferung ist zudem noch der Ort der Anbindung an die Substanz zu steuern, wenn man den pH so wählt, daß z.B. nur eine Aminogruppe unprotoniert vorliegt.

Patentansprüche :

1. Polymere bestehend aus mindestens einem bioabbaubaren Block und mindestens einem hydrophilen nicht bioabbaubaren Block.
2. Polymere bestehend aus mindestens einem bioabbaubaren Block und mindestens einem hydrophilen langsam bioabbaubaren Block.
3. Polymere nach Anspruch 1 oder 2, deren hydrophiler Block eine oder mehrere funktionelle Gruppen enthält.
4. Polymere nach Anspruch 1 oder 2, deren nichtabbaubarer Block mit einer oder mehreren aktiven funktionellen Gruppe endet.
5. Polymere nach Anspruch 1 oder 2, deren bioabbaubarer Block aus einem Polyester besteht und deren nicht abbaubarer Block aus Poly(ethylenglycol) besteht der an seinen Enden unterschiedliche funktionelle Gruppen trägt.
6. Polymere nach Anspruch 1-5, deren Blöcke linear oder verzweigt sind.
7. Polymere nach Anspruch 6, deren bioabbaubarer Block aus Poly(lactid), Poly(glycolid) oder Poly(lactid-co-glycolid) besteht und deren nicht-abbaubarer Block aus Poly(ethylenglycol)amin besteht.
8. Polymere nach Anspruch 6, deren Aminogruppe durch Bindung an weitere Moleküle aktiviert ist.
9. Polymere nach Anspruch 8, die an der Aminogruppe eine Dicarbonsäure als Halbamid tragen.
10. Polymere nach Anspruch 8, die an der Aminogruppe mit einer Weinsäure oder Bernsteinsäure amidiert sind.
11. Polymere nach Anspruch 9 und 10, deren freie Carboxylgruppe der Dicarbonsäure aktiviert ist oder die im Syntheseverlauf mit Reagenzien aktiviert wird.
12. Polymere nach Anspruch 11, deren Carbonsäurefunktion als Succinimidylester vorliegt.
13. Polymere nach Anspruch 1-12 an die Substanzen chemisch gebunden sind.

14. Filme, Partikel und Formkörper aus Polymeren nach Anspruch 1-13.

15. Ein Verfahren zur chemischen Strukturierung der Oberflächen bioabbaubarer Polymere bei dem:

- a) die Polymere für die Reaktion mit einem Substrat aktiviert sind und
- b) die unspezifische Adhäsion von Zellen und Adsorption von Molekülen gezielt unterdrückt wird und
- c) die zu bindende Substanz in Lösung oder an der Festphase abreagiert.

15. Ein Verfahren zur chemischen Strukturierung der Oberflächen bioabbaubarer Polymere bei der mindestens eine Substanz mit örtlich konstanter oder variabler Dichte auf die Oberfläche aufgebracht wird.

16. Ein Verfahren zur chemischen Strukturierung der Oberflächen bioabbaubarer Polymere nach Anspruch 14-15, bei dem die Strukturierung durch einen Plotter oder einen Tintenstrahldrucker erzeugt wird.

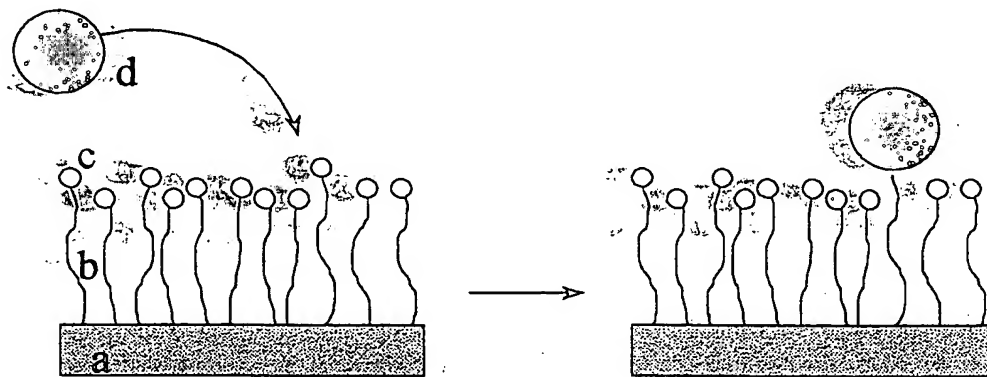
17. Ein Verfahren zur chemischen Strukturierung der Oberflächen bioabbaubarer Polymere nach Anspruch 14-15, bei dem die Strukturierung durch Bestrahlung mit Licht erreicht wird.

18. Ein Verfahren zur chemischen Strukturierung der Oberflächen bioabbaubarer Polymere bei dem sich die Oberflächeneigenschaften zeitlich gesteuert ändern.

19. Ein Verfahren zur Herstellung von Polymerpartikeln mit bioadhäsiven Eigenschaften.

20. Ein Verfahren zur Diagnose bei dem das Analysat an einen Polymerträger gebunden wird, der die Abtrennung aus der Probe erlaubt.

Abbildungen



Polymeroberfläche

Abbildung 1 : Anheftung einer Substanz an die Polymeroberfläche (a: Bioabbaubarer Block als Polymerbulk dargestellt (z.B. PLA), b: hydrophiler Polymerteil (z.B. PEG), c: Funktionelle Gruppe oder aktivierte Endgruppe, d: anzuheftende Substanz (z.B. Peptid oder Protein).

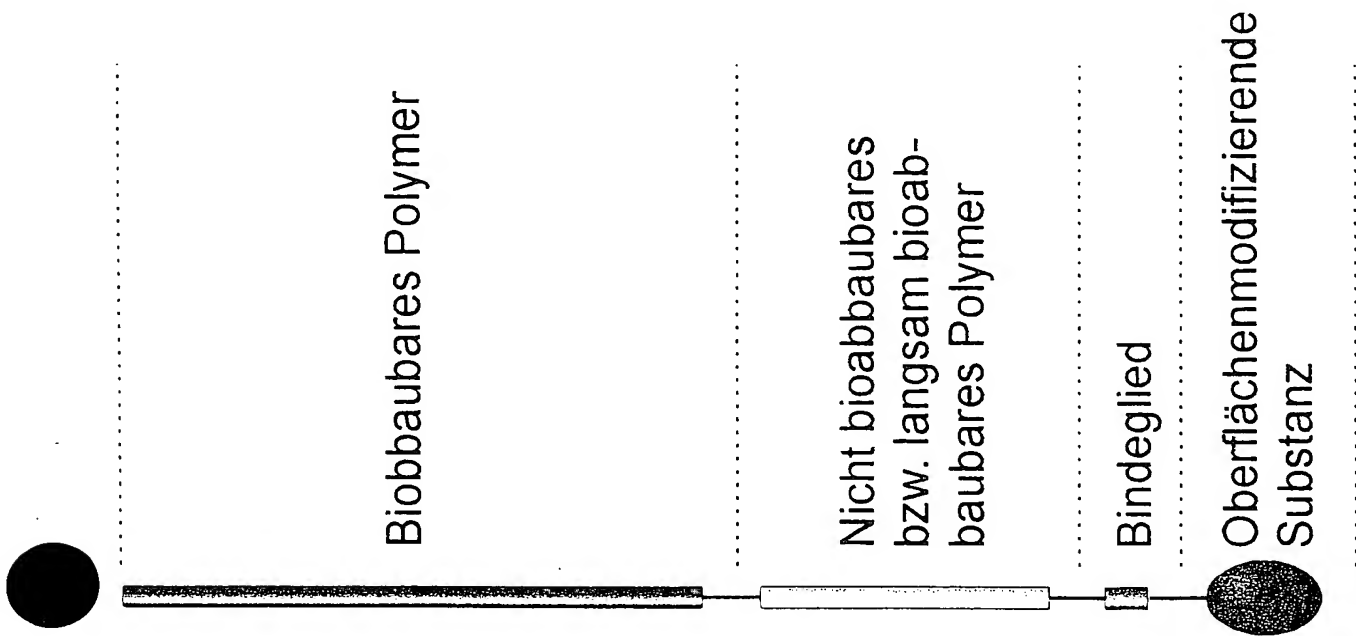


Abbildung 2 : Beispiel für die Zusammensetzung eines reaktiven Polymers

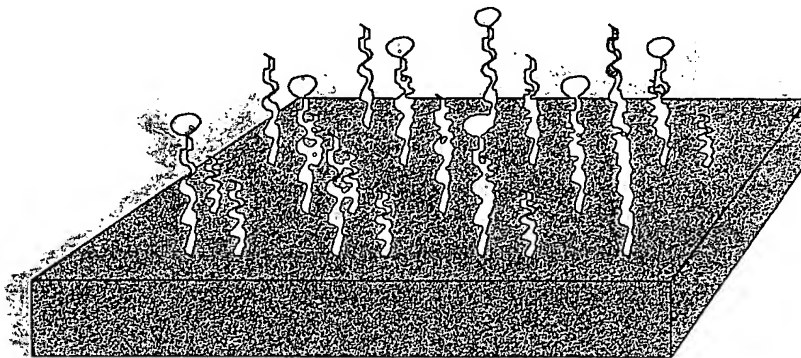
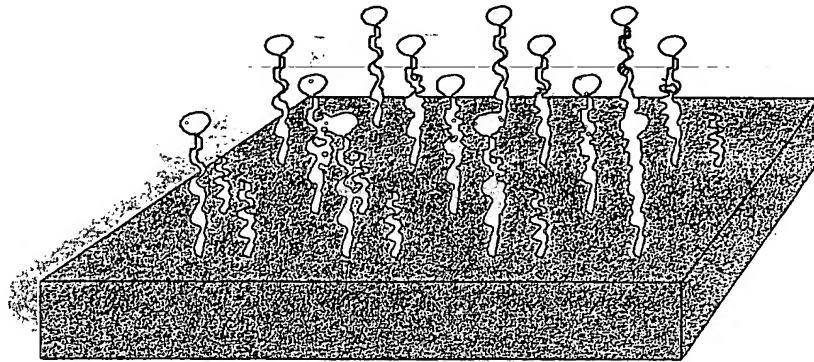


Abbildung 3 Oberfläche eines reaktiven Polymers mit zwei unterschiedlichen Substanzen belegt;

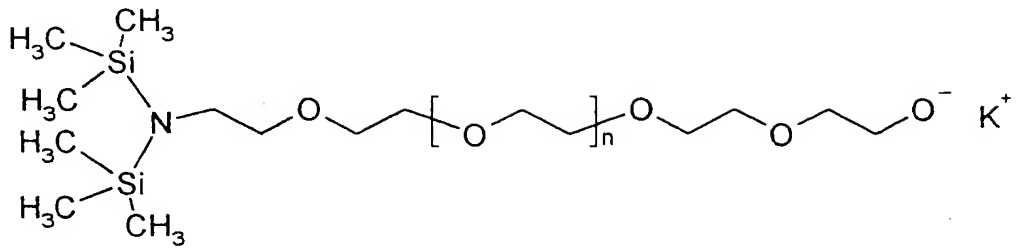
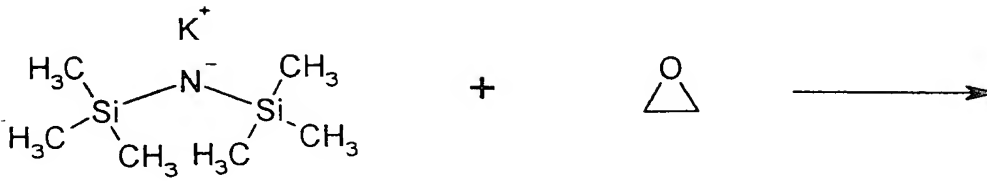


Abbildung 4: Synthese von NH_2PEG

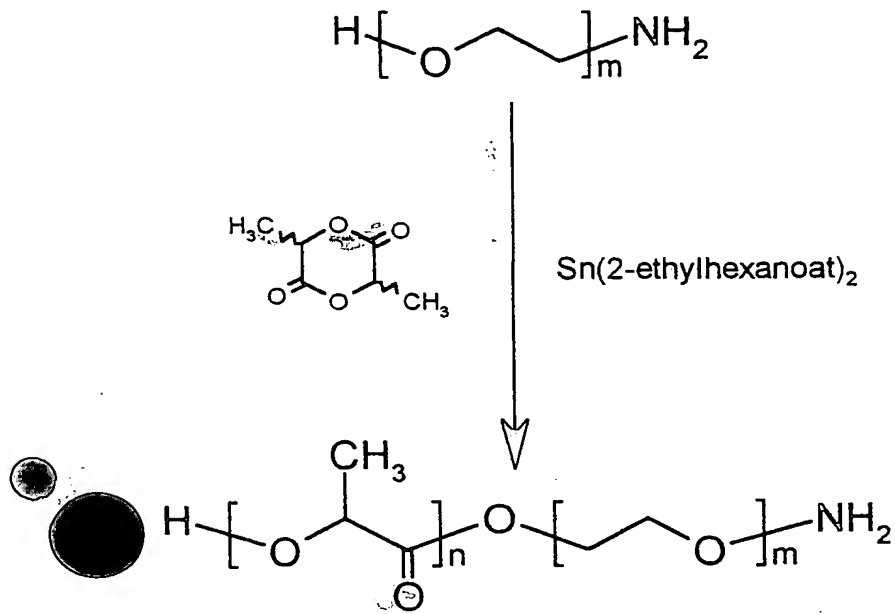


Abbildung 5: Synthese eines Copolymeres am Beispiel von PEG-PLA

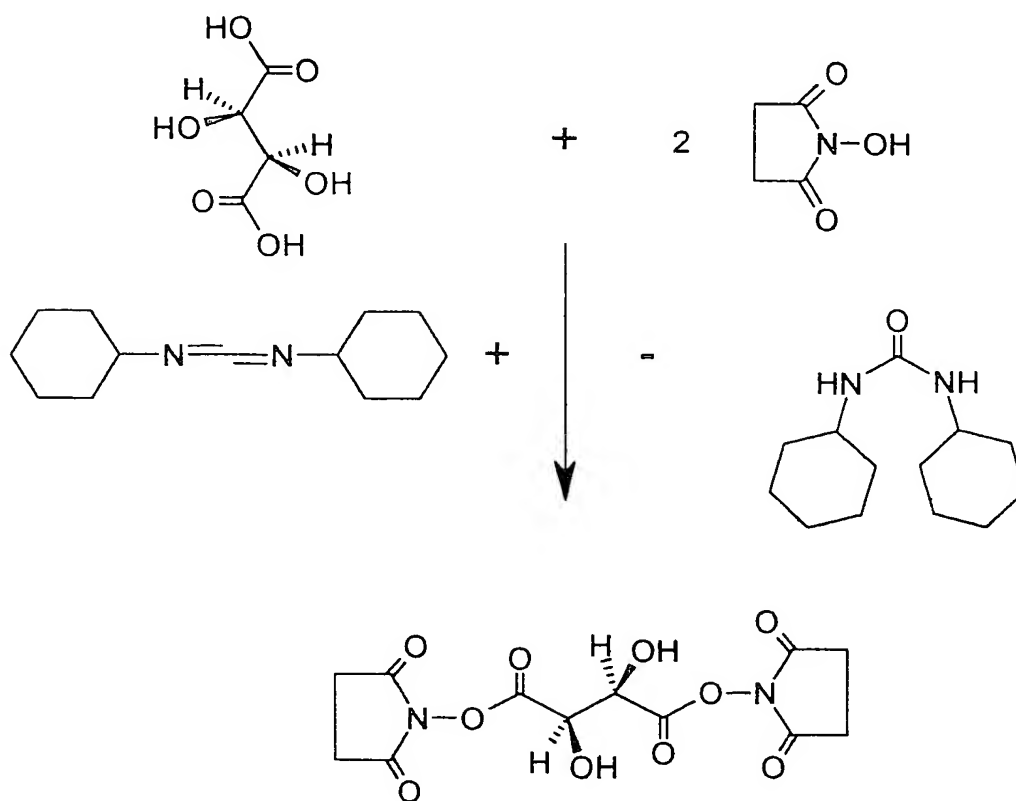


Abbildung 6: Synthese von Disuccinimidylweinsäure

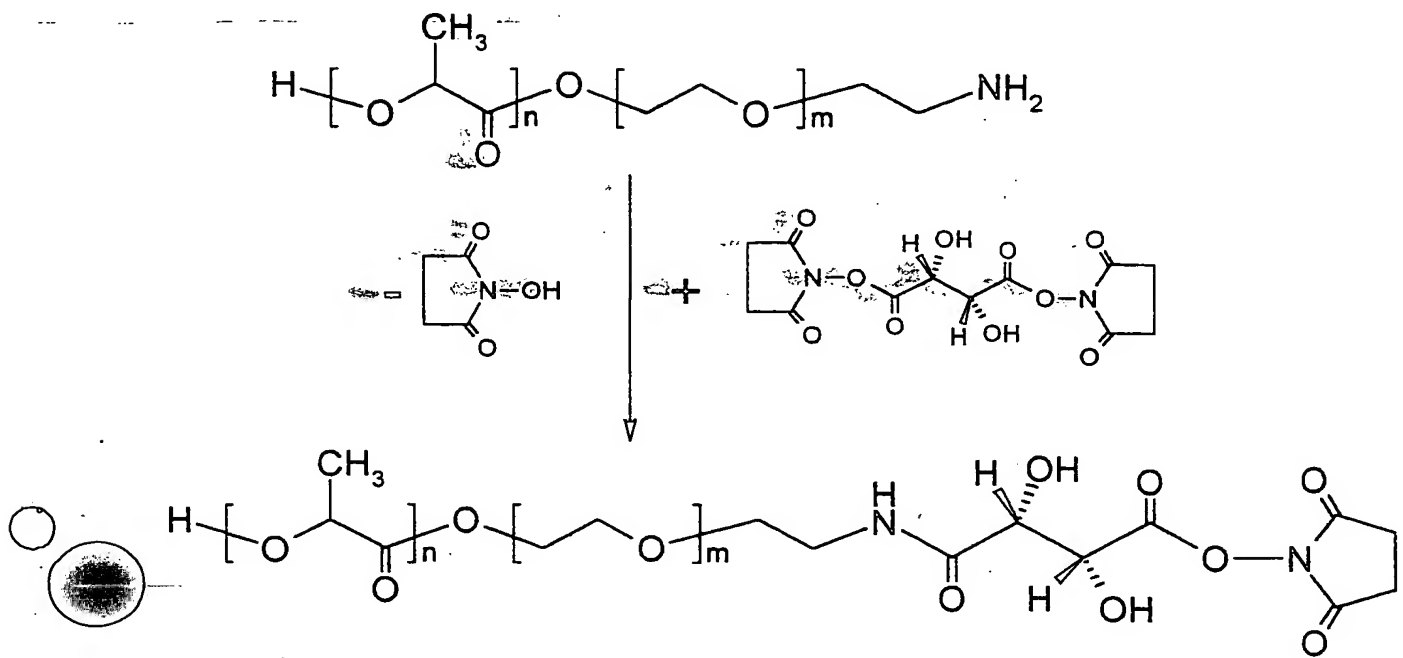


Abbildung 7: Aktivierung des PEG-PLAs zum aktiven Polymer

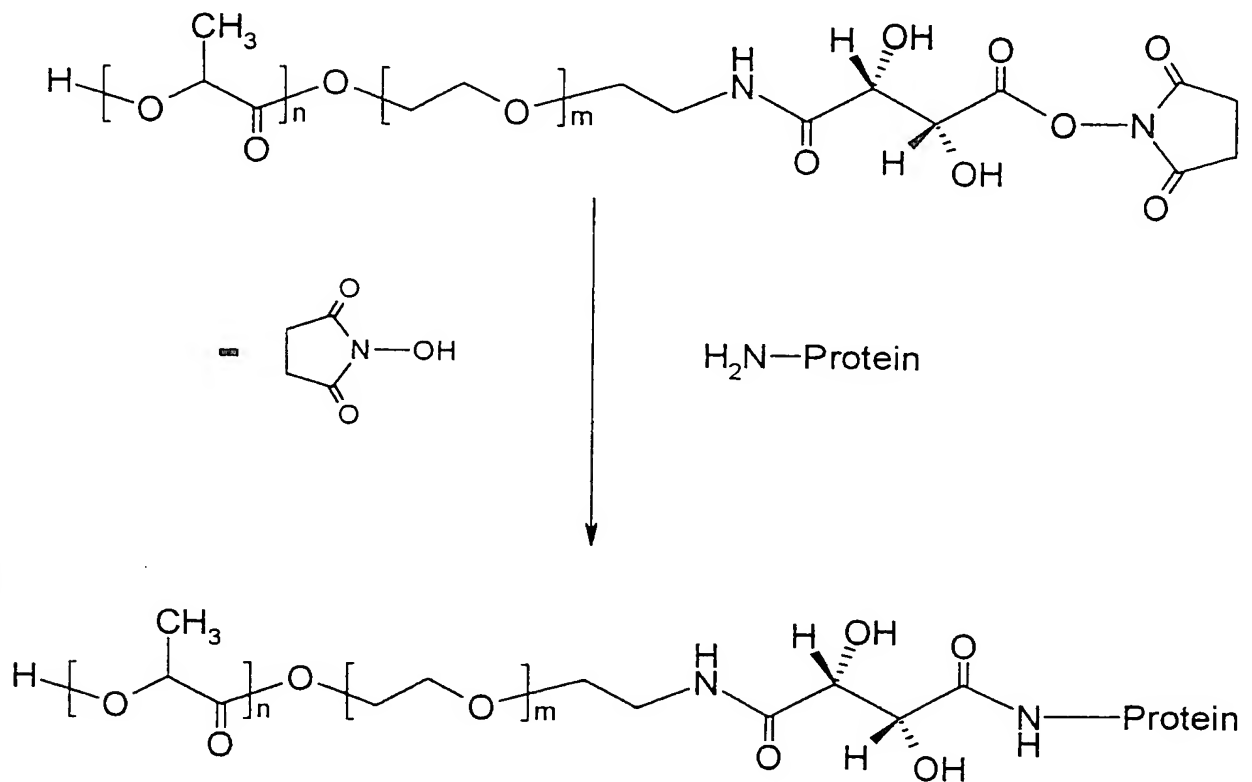


Abbildung 8: Anknüpfung eines Proteins

Lit raturliste

- 1 "Dictionary of Science and Technology" Academic Press, 1992:
- 2 "Handbook of biodegradable Polymers" Harwood acad. publ. Inc., 1997:451-472.
- 3 Anderson GW, Zimmermann JE, Callahan EM : "The Use of Esters of N-Hydroxysuccinimide in Peptide Synthesis" J Am Chem Soc 86 1964 S.1839-1842
- 4 Armstrong TI, Davies MC, Illum L : "Human serum albumin as a probe for protein adsorption to nanoparticles: relevance to biodistribution" J Drug Targeting 4 1997 S.389-398
- 5 Asano M, Fukazaki H, Yoshida M, et al : "In vivo characteristics of low molecular weight copoly(L-Lactide/glycolide) formulations with controlled release of LH-RH agonist" Biomaterials 10 1989 S.569-573
- 6 Babensee JE, Anderson JM, McIntire LV, Mikos AG : "Host Response to Tissue Engineered Devices" Adv Drug Delivery Rev 33 1998 S.111-139
- 7 Barrera, D. A. "Synthesis and Characterization of a novel Biodegradable Polymer = Poly(lactic acid-co-lysin)". 1993. Massachusetts Institute of Technology. PHD Thesis
- 8 Barrera, D. A., Langer, R., Lansbury, P. T., and Vacanti, J. P. "Biodegradable Polymers for Cell Transplantation" US5399665 Date of Patent: 21-3-1995.
- 9 Burkersroda F, Gref R, Göpferich A : "The Erosion of Biodegradable Block Copolymers made of Poly(D,L-lactic acid) and Poly(ethylene glycol)" Biomaterials 18 1998 S.1599-1607
- 10 Cahalan, P. T., Verhoeven, M., Hendrics, M., and Cahalan, L. "Biocompatibility of solid Surfaces" US5308641 Date of Patent: 3-5-1994.
- 11 Camble, R., Timms, D., and Wilkinson, A. J. "Continuous Release Pharmaceutical Compositions" US5320840 Date of Patent: 14-6-1994.
- 12 Cima, L. G., Merrill, E. W., and Kuhl, P. R. "Cell growth substrates with tethered cell growth effector molecules" US5906828 Date of Patent: 25-5-1999.

- 13 Cook, A. D. and Drumheller, P. D. "Materials and Methods for the Immobilization of bioactive Species onto polymeric Substrates" WO9746267A1
Date of Patent: 11-12-1997.
- 14 Cook AD, Hrkach JS, Gao NN, et al : "Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial" J.Biomed.Mater.Res. 35 1997 S.513-523
- 15 Crane GM, Ishaug SH, Mikos AG : "Bone tissue engineering" Nat.Med.(N.Y.) 1 1995 S.1322-1324
- 16 Drumheller, P. D. "Materials and Methods for the Immobilization of bioactive Species onto polymeric Substrates" US5897955 Date of Patent: 27-4-1999.
- 17 Drumheller PD, Hubbell JA : "Polymer networks with grafted cell adhesion peptides for highly biospecific cell adhesive substrates" Anal.Biochem. 222 1994 S.380-388
- 18 Fukazaki H, Yoshida M, Asano M, et al : "In vivo characteristics of high molecular weight copoly(L-Lactide/glycolide) with S-type degradation pattern for application in drug delivery systems" Biomaterials 12 1991 S.433-437
- 19 Göpferich A : "Mechanisms of Polymer Degradation and Erosion" Biomaterials 17 1996a S.103-114
- 20 Göpferich A : "Polymer Degradation and Erosion: Mechanisms and Applications" Eur.J.Pharm.Biopharm. 42 1996b S.1-11
- 21 Göpferich A. "Mechanism of Polymer Degradation and Elimination" In: Domb A, Kost J Wiseman D, eds. Handbook of Biodegradable Polymers. Harwood acad. publ. Inc., 1997:451-472.
- 22 Göpferich A, Peter S, Lucke A, Lu L, Mikos AG : "Biodegradable Polymers for the regulation of peptide adsorption and cell adhesion" J.Biomed.Mater.Res. 1999
- 23 Göpferich A, Tabata Y, Minamitake Y, Shieh L, Alonso MJ, Langer R. "Drug Delivery from Bioerodible Polymers: Systemic and Intravenous Administration" In: Cleland J Langer R, eds. Protein Formulations and delivery. Washington: American Chemical Society, 1994:242-277.

- 24 Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R :
"Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres" Science 263 1994
S.1600-1603
- 25 Guire, P. E. "Biocompatible Device with covalently bonded Biocompatible
Agent" US5263992 Date of Patent: 23-11-1993.
- 26 Hermanson GT "Bioconjugate Techniques" San Diego: Academic Press, 1996:
- 27 Herold DA, Keil K, Bruns DE "Oxidation of polyethylene glycols by alcohol
dehydrogenase" Biochem.Pharmacol. 38 1989 S.73-76
- 28 Herrmann JB, Kelly RJ, Higgins GA : "Polyglycolic acid sutures" Arch.Surg.
100 1970 S.486-490
- 29 Hill M, Bechet JJ, d'Albis A : "Disuccinimidyl esters as bifunctional crosslinking
reagents for proteins: assays with myosin" FEBS Lett. 102 1979 S.282-286
- 30 Hubbell JA "A new for old urinary bladder" Nature 398 1999 S.198-199
- 31 Hubbell J A, Massia S P and Desai N P "Surfaces having desirable cell
adhesive effects" US5330914 Date of Patent: 19-7-1994.
- 32 Juliano RL "Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of
liposomes, microspheres and emulsions" Adv Drug Delivery Rev. 2 1988 S.31-
54
- 33 Kratz F : "Drug targeting in antineoplastic chemotherapy: antigens and
receptors in the tumor cell surface as an attack point for selective
chemotherapy" Pharm.Unserer Zeit 24 1995 S.14-26
- 34 Kreuter J : "Drug targeting with nanoparticles" Eur.J Drug
Metab.Pharmacokinet 19 1994 S.253-256
- 35 Kricheldorf HR, Kreiser-Saunders I : "Polylactides - Synthesis, Characterization
and Medical Application" Macromol.Symp. 103 1996 S.85-102
- 36 Langer R, Vacanti JP : "Tissue Engineering" Science 260 1993 S.920-926
- 37 Larm, K. O., Adolfsson, L. A., and Olsson, K. P. "Process for the Preparation of
Surface modified Solid Substrates" US5049403 Date of Patent: 17-9-1991.

- 38 Leenslag JW, Pennings AJ : "Synthesis of high-molecular-weight poly(L-lactide) initiated with tin 2-ethylhexanoate" Makromol.Chem. 188 1987 S.1809-1814
- 39 Leenslag JW, Pennings AJ, Bos RR, Rozema FR, Boering G : "Resorbable materials of poly(L-lactide). VII. In vivo and in vitro degradation" Biomaterials 8 1987 S.311-314
- 40 Matsuda, T., Sugawara, T., Inoue, K., and Tani, N. "Process for modifying Surfaces of Materials" US5240747 Date of Patent: 31-8-1993.
- 41 Mikulec LJ, Puleo DA : "Use of p-nitrophenyl chloroformate chemistry to immobilize protein on orthopedic biomaterials" J.Biomed.Mater.Res. 32 1996 S.203-208
- 42 Miller ND, Williams DF : "The in vivo and in vitro degradation of PGA suture material as function of applied strain" Biomaterials 5 1984 S.365-368
- 43 Niklason LE, Gao J, Langer R, et al : "Functional Arteries grown in Vitro" Science 284 1999 S.489-493
- 44 Palmer BM, Bizios R : "Quantitative characterization of vascular endothelial cell morphology and orientation using Fourier transform analysis" J.Biomech.Eng. 119 1997 S.159-165
- 45 Park K, Shalaby WSW, Park H. "Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery" Lancaster, USA: Technomic Publishing Company, Inc., 1993:
- 46 Patel N, Padera R, Sanders GH, et al : "Spatially controlled cell engineering on biodegradable polymer surfaces" FASEB J. 12 1998a S.1447-1454
- 47 Patel, N., Padera, R., Sanders, G. H., Cannizzaro, S. M., Davies, M. C., Langer, R., Roberts, C. J., Tendler, S. J., Williams, P. M., and Shakesheff, K. M. "Spatially controlled Tissue Engineering on Biodegradable Polymer Surfaces". 25(1), 109-110. 1998. Controlled Release Society, Inc. Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 1998.
- 48 Puleo DA : "Activity of enzyme immobilized on silanized Co-Cr-Mo" J.Biomed.Mater.Res. 29 1995 S.951-957

49 Puleo DA : "Biochemical surface modification of Co-Cr-Mo" Biomaterials 17
1996 S.217-222

50 Puleo DA : "Retention of enzymatic activity immobilized on silanized Co-Cr-Mo
and Ti-6Al-4V" J.Biomed.Mater.Res. 37 1997 S.222-228

51 Saltzman WM : "Growth factor in Tissue Engineering" MRS Bulletin 21 1996
S.62-65

52 Schulman LH, Pelka H, Reines SA : "Attachment of protein affinity-labeling
reagents of variable length and amino acid specificity to E. coli tRNA^{fMet}"
Nucleic.Acids.Res. 9 1981 S.1203-1217

53 Suggs LJ, Mikos AG. "Synthetic Biodegradable Polymers for Medical
Applications" In: Mark JE, ed. Physical Properties of Polymers Handbook. New
York: American Institute of Physics, 1996:615-624.

54 Tabata Y, Ikada Y : "Effect of the size and surface charge of polymer
microspheres on their phagocytosis by macrophage" Biomaterials 9 1988
S.356-362

55 Vert M, Eijken J, Albertson A, Scott G, Chiellini E : "Degradable Polymers and
Plastics" Redwood Press Ltd., 1992:73-92.

56 Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, et al : "Synthesis of poly(ethylene oxide)
with heterobifunctional reactive groups at its terminals by an anionic initiator"
Bioconjug.Chem. 3 1992 S.275-276

57 Zalipsky S, Barany G : "Facile Synthesis of α -Hydroxy-w-
Carboxymethylpolyethylene oxide" J.Bioact.Compat.Polym. 5 1990 S.227-231